

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

INABA, Shigeru
Naruse, Inaba & Inami
Hanabishi Imas Hirakawacho Building
4th Floor
3-11, Hirakawacho 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0093
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 March 2001 (19.03.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference C317-00-31	
International application No. PCT/JP00/06045	International filing date (day/month/year) 06 September 2000 (06.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address INABA, Shigeru Furuya Building, 3rd floor 3-29, Kioicho Chiyoda-ku, Tokyo 102-0094 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 03-3556-7281	
	Facsimile No. 03-3556-7250	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address INABA, Shigeru Naruse, Inaba & Inami Hanabishi Imas Hirakawacho Building 4th Floor 3-11, Hirakawacho 2-chome Chiyoda-ku, Tokyo 102-0093 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 03-3512-2871	
	Facsimile No. 03-3512-2870	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Y. KUWAHARA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 17 May 2001 (17.05.01)	Applicant's or agent's file reference C317-00-31
International application No. PCT/JP00/06045	Priority date (day/month/year) 09 September 1999 (09.09.99)
International filing date (day/month/year) 06 September 2000 (06.09.00)	
Applicant SAITO, Takashi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
04 April 2001 (04.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/19953 A1

(51) 国際特許分類: C12M 1/00, C12N 15/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06045

(22) 国際出願日: 2000年9月6日 (06.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/255024 1999年9月9日 (09.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
先端科学技術インキュベーションセンター (CEN-
TER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOL-
OGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京

都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内ビルデ-
ィング6階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 敬 (SAITO,
Takashi) [JP/JP]; 〒153-0041 東京都目黒区駒場4丁目
7番21号 セビリア駒場103号 Tokyo (JP).

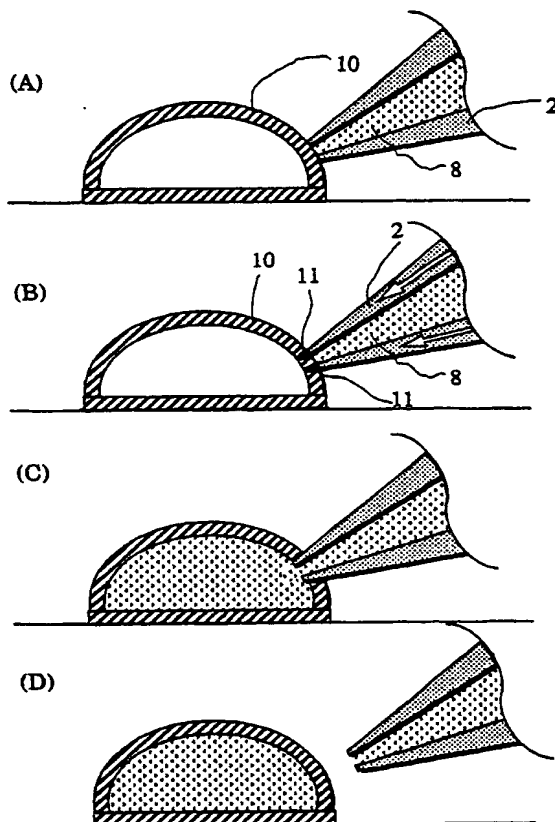
(74) 代理人: 稲葉 滋 (INABA, Shigeru); 〒102-0094 東京
都千代田区紀尾井町3-29 フルヤビル3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF PIERCING MEMBRANE AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: 膜の穿孔方法および装置



(57) Abstract: A method which comprises bringing a membrane denaturing material, which undergoes a membrane denaturation reaction induced by a stimulus, into contact with at least a part of a membrane (10) or close thereto; thereby stimulating the membrane denaturing material so as to denature the membrane (10); and piercing the membrane (10) by using a membrane breaking member (1); wherein the stimulus is imparted via the membrane breaking member (10). Thus, the effect of the membrane breaking agent on the substance, in which the stimulus is transmembranely injected, can be prevented as far as possible. It is also possible to favorably stimulate a specific site, though the apparatus has a simple constitution.

WO 01/19953 A1

[続葉有]



RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体を、膜10の少なくとも一部に接触あるいは近接させ、該膜変性体に該刺激を与えることで膜10を変性させて膜破壊部材1によって膜10を穿孔する方法であって、該刺激は膜破壊部材10を媒体として与えられる。刺激を膜内に注入される物質が膜破壊剤の影響を受けることを可及的に防止する。また、簡単な構成でありながら、局所的に良好に刺激を与えることができる。

明 細 書

膜の穿孔方法および装置

技術分野

本発明は、膜変性剤等を用いて細胞膜等の膜を部分的に処理することにより膜を穿孔する方法および装置、あるいは該穿孔手法を用いたマイクロインジェクション装置に関する。

背景技術

遺伝子治療や、生物を利用した人工的な物質生産系等において、細胞内に核酸や蛋白質の物質を導入する手法は極めて重要である。一方、細胞内から核等の組織を取り出す技術も近年重要視されている。したがって、生物を構成する基本単位である細胞に対して物質を注入したり取り出したりすることは生物工学の基本技術であると言える。

従来における膜破壊や膜の穿孔は、物理的剪断力に依存していた。しかしながら、キャピラリーの剪断力を用いたような細胞膜破壊は、施術者の熟練を要し、また、卵細胞以外の一般の細胞には細胞膜の柔軟性故にキャピラリーが刺入できない場合も多い。これに対して、物理的剪断力に依存しない手法として、膜変性反応を引き起こす物質（膜破壊剤）を利用する膜破壊方法が提案されている（PCT/JP99/01223）。膜破壊剤とは、選択された特定の刺激をトリガーとして膜変性反応を誘起する物質であり、膜破壊の程度を制御することで、穿孔後に膜が自己修復するような穿孔手法が可能となる。

この穿孔手法においては、膜破壊剤を細胞に接触あるいは近接さ

せる必要があるが、一つの形態としては、膜破壊剤としての光増感剤が細胞の一部にキャピラリーを介して直接接触されており、光を細胞周辺全体（例えば、キャピラリーの接触した細胞を含む約100マイクロメートルの円形領域）に照射する手法が挙げられる。

このものでは、膜破壊剤を接触させるキャピラリーを大体含むように光照射が行われることになり、キャピラリーの内部に細胞へ注入する物質と膜破壊剤を混合したものが充填されているような場合には、キャピラリー先端だけでなく、キャピラリー内部に含まれる膜破壊物質も光照射によって活性化され、活性酸素を生成する。

したがって、キャピラリー内に充填してある細胞への注入を目的とした物質が、遺伝子等の化学的に弱い物質である場合には、この活性酸素により損傷されてしまう恐れがあった。

このような損傷を避ける手法としては、キャピラリーの先端にのみピンポイントで光を照射する方法も考えられるが、キャピラリーの先端と連動した光焦点調節機構が必要となり、装置として高価になってしまうという不具合がある。

したがって、本発明は、膜変性反応を引き起こす膜変性体を利用する膜破壊方法の改良に関するものであり、刺激を膜内に注入される物質が膜破壊剤の影響を受けることを可及的に防止することを目的とするものである。

また、本発明が解決しようとする課題は前記のものに限定されない。例えば、キャピラリーや細胞刺入用センサーを生体組織内等で用いるような場合には、キャピラリーや細胞刺入用センサーの先端部に局所的に刺激（例えば光）を与えることは困難であった。したがって、本発明の他の目的は、簡単な構成でありながら、局所的に良好に刺激を与えることができる方法および装置を提供することにある。

発明の開示

本発明が採用した技術手段は、膜変性体に与える刺激を、膜変性体を保持する保持体、あるいは膜を破壊する膜破壊部材、あるいは他の刺激伝搬部材を介して伝搬させることを特徴としている。このように、ある部材を介して刺激を伝搬させることで、ある部位を選択して局所的に刺激を与えることができる。保持体、膜破壊部材、刺激伝搬部材はそれぞれ別体の構成要素として用いることも可能であるが、一つの好ましい態様では、保持体、膜破壊部材、刺激伝搬部材は同一の部材から構成される。

本発明の重要な構成要素である刺激と刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体の組み合わせについて、好適な例である光と光増感剤に基づいて説明する。物理的剪断力以外の方法で細胞膜を一時的かつ部分的に変性・破壊する方法として、リン脂質ラジカル連鎖過酸化反応に着目することができる。一重項酸素やスーパーオキシドラジカルといった活性酸素は細胞膜の不飽和リン脂質を連鎖反応で過酸化する。それに対して細胞は膜中のラジカル捕獲剤である α -tocopherol (ビタミン E) や、水溶性の抗酸化剤である L-ascorbic acid (ビタミン C)、superoxide dismutase (SOD) 等の酸化防衛機構を持ち、酸化に抵抗する。このような連鎖酸化作用が酸化防衛能を超えると、リン脂質膜破壊は連鎖反応によって指数関数的に急速に進行し、細胞膜がイオン透過阻止能を失うため、細胞は代謝維持が不可能となり、連鎖膜破壊が進行すると最終的には細胞は死滅する。

光により活性酸素を生成し、このような脂質連鎖過酸化反応のトリガーとなる分子は光増感剤 (Photosensitizer, PS) と呼ばれる。一般的な光増感剤としては、ローズベンガル、ポルフィリン等が

挙げられる。このような光増感剤を膜変性剤として使用することで、膜の変性に際しては、目標となる最小限の細胞表面に部分的に短時間連鎖過酸化反応を起こすだけでよく、しかも膜穿孔作業の際に過酸化反応により傷害を受けた膜は、穿孔後に膜自身の流動性、または上記抗酸化系により修復される。すなわち、光増感剤の量や光の照射時間等を制御することによって、膜破壊の程度を制御し、穿孔を容易に行うと同時に、細胞が死滅せずに膜を修復させることができる。

刺激と膜破壊剤の好適な組み合わせとして光と光増感剤について説明したが、膜を変性または破壊するために用いられる膜変性体と刺激との組み合わせは、膜が完全に破壊されるのではなく、制御可能な状態で穿孔することが可能ものであればいかなる組み合わせでもよい。

一つの好ましい態様では、膜破壊剤は酸化チタン等の光触媒であり、刺激は該光触媒を活性化させる光（酸化チタンの場合には紫外線）である。光触媒は光を照射することで、活性酸素の生成を促進する。活性酸素により、細胞膜は酸化され、流動性や柔軟性が減少する。

本発明で採用される刺激は、保持体、膜破壊部材、あるいは刺激伝搬部材を媒介して伝搬されるものであることが必要であり、好適には、刺激は、光、電気、熱、振動からなる群から選択される。刺激が光の場合には、保持体、膜破壊部材、あるいは刺激伝搬部材は、膜変性反応を誘起する波長を透過する材質から形成されており、例えば、ソーダガラス、石英ガラス、アクリル樹脂、スチロール樹脂等の素材から形成される。刺激が熱の場合には、保持体、膜破壊部材、刺激伝搬部材は熱伝導性が良好な部材から形成されるのが良く、金、白金、タングステン、アルミ、銅あるいはこれらの合金、

セラミック素材から形成される。刺激が電気の場合には、保持体、膜破壊部材、刺激伝搬部材は導電性の良い部材から構成され、例えば、金、白金、タングステン、アルミ、銅等あるいはこれらの合金、ポリピロール、ポリオフェン等の導電性高分子、カーボンナノチューブ等の炭素系の素材から構成される。

本発明に採用し得る刺激は、前記のものに限定されず、光を含む電磁波、放射線を含む粒子線、加熱、冷却、電気、磁気、超音波を含む振動、物理接触、化学物質、細胞を含む生物（例えば白血球）、ウイルス等が例示され、あるいはこれらの任意の組み合わせであってもよい。例えば、支持体あるいは膜破壊部材として例示するキャピラリーの先端に発光素子が設けてあり、該素子を発光させるための電力をキャピラリー経由で送ることも考えられる。

刺激によって膜の変性を誘起する膜変性体（主として化合物）としては、膜変性や膜破壊に関与する酵素、抗体分子、膜結合蛋白質、糖脂質、脂質等を用いることが可能であるし、光増感剤であるポルフィリン、ローズベンガル、メチレンブルー、アシッドレッド、 α ターチエニル等およびそれらの誘導体を用いることもできる。更に光触媒である酸化チタン、酸化亜鉛等を用いることもできる。また、活性酸素種等の酸化剤、還元剤、ニトログリセリン・ピクリン酸等爆発性化合物、磁性微粒子・磁性流体、金属粒子・半導体粒子・絶縁体粒子・光電変換素子・圧電素子等も採用し得る。これらの化合物は単独に用いても良く、あるいは複数のものを組み合わせて併用してもよい。

保持体、膜破壊部材、あるいは刺激伝搬部材は、具体的には、キャピラリー（実施の形態で示す光ファイバー入りキャピラリーを含む）、細胞刺入用センサー等から構成される。尚、本明細書においては、キャピラリーはガラス製のキャピラリーを含む微小管状部材

の総称として用いており、その材質は特には限定されない。尚、膜破壊部材、保持体、刺激伝搬部材は、前記のものに限定されるものではなく、例えば、結晶体、C₆₀等のマクロ化合物、マイクロピペット、ガラス微小電極、パッチ電極、金属微小電極、ワイヤー、ひげ結晶、細胞を含む生物、磁性微粒子、磁性流体、金属粒子、半導体粒子、絶縁体粒子、光電変換素子、圧電素子、マイクロマシン等の微小構造物並びにこれらを複合化した物体を挙げることができる。

保持体、膜破壊部材、あるいは刺激伝搬部材の形状は特には限定されず、剣山状、球状、針状、棒状、管状等の形状、またはこれらの組み合わせ等が採用され得る。例えば管状部材としては、具体的にはピペット、チューブ、注射針、キャピラリー等が例示し得る。球状部材は、例えばレーザーピンセット法により操作可能なビーズである。膜変性体を保持する保持体において、膜変性体を保持する部位（膜変性促進部位と言うこともできる）は目的に応じて保持体の表面全体であっても構わないし、表面の一部であっても構わない（例えば、保持体がビーズの場合に、ビーズの球面全体であっても、あるいは選択されたある部分であってもよい。）。保持体に膜変性体を塗布あるいは固定等する手段は、溶媒蒸発乾燥、スパッタリング、真空蒸着、プラズマ重合、化学吸着、物理吸着、ラジカル重合、イオン重合等が例示列挙される。また、保持体は、その内部に膜変性体を充填したものであってもよい（例えば、保持体がキャピラリーであり、内部に膜変性体を充填してある場合）。

本発明では、刺激は膜破壊部材、あるいは支持体、あるいは刺激伝搬部材は刺激を伝搬する必要があり、刺激の伝搬方向が制御できるものであることが望ましい。伝搬方向が制御可能な刺激としては、好適には、光あるいは電気が挙げられる。膜破壊部材、保持体が

キャピラリーの場合を例に説明すると、光の場合は、公知の光ファイバー技術により適正に反射層が組み込まれたキャピラリーを採用すれば、光は漏れの問題を生ぜずに良好にキャピラリーの周壁内を延出方向に伝搬する。電気の場合は、導電層の上に絶縁層を設け、細胞に接触する部分だけ絶縁物質の無い構成にすることで伝搬方向を制御することができる。尚、熱の場合も、熱伝達性の良い層の上に効率の良い断熱層を設けることが可能であれば採用し得る。そのほか、超音波振動のような機械的刺激を行う方法も考えられる。例えば、保持体を通じた振動によって、マイクロカプセルに封入した細胞膜破壊剤のカプセルを破壊し、破壊剤を放出させることも考えられる。

膜は、光電変換素子や圧電素子を含む膜であってもよいし、動植物の細胞膜や細胞壁、生体膜、あるいは人工膜であってもよい。生体膜としては、細胞壁、細胞外被、細胞膜を含む細胞内膜、核膜、ウイルス膜、細胞質微小管、ミクロソーム膜、ゴルジ装置膜、リソソーム膜、膜胞体膜、液胞膜、ペルオキシソーム膜、プラズチド膜、リボソーム膜、ミトコンドリア膜が挙げられる。人工膜としては、タンパク質膜、脂質膜、コラーゲン等高分子膜、金属膜、半導体膜、絶縁体膜、ポリアセチレン・ポリチオフェン等導電性高分子膜等が挙げられる。

注入を目的とする物質は、通常の拡散では膜透過が困難な物質、人工的に膜透過を多量に行う目的の物質等が挙げられ、具体的には核酸、蛋白質、脂質、膜構造体、マイクロマシンや微小磁性体粒子等の人工物等が挙げられる。尚、注入を目的とする物質がキャリアと共に注入されることは任意である。ここで、キャリアとは、注入を目的とする物質を溶解したり懸濁したりすることが可能な気体、液体または固体のことで、例えば核酸を溶解した緩衝液等が挙げら

れる。

図面の簡単な説明

第1図(A)は好適な実施の形態に係るマイクロインジェクション装置の概略図であり、第1図(B)はキャピラリーの周壁の端面と光ファイバーとの位置関係を示す図であり、第1図(C)は膜に形成された膜変性部位を示す図であり、第2図(A)～(D)はキャピラリーの先端が細胞膜に刺入される過程を示す概略図であり、第3図は膜穿孔技術のフローチャート図であり、第4図は他の好適な実施の形態に係るマイクロインジェクション装置の概略図であり、第5図(A)～(D)は水溶性蛍光染色試薬を細胞内に注入する過程を示す概略図であり、第6図はインジェクション成功率の比較を示すグラフであり、blank:酸化チタン膜なしキャピラリー、120nm:酸化チタン120ナノメートル膜厚付きキャピラリー、180nm:酸化チタン180ナノメートル膜厚付きキャピラリー、UV:紫外光照射1分間を示している。

発明の実施するための最良の形態

図1は、本発明を採用したマイクロインジェクション装置の好ましい一つの実施の形態を示す概略図であって、このものでは、刺激として光を、膜変性反応を誘起させる化合物として光増感剤を、それぞれ採用している。

マイクロインジェクション装置は、膜破壊部材、膜変性体の保持体、刺激伝搬部材、所定物質の注入部材を一部材で構成するキャピラリー1を備えており、キャピラリー1の先端側は縮径して先細り状となっており、先端の開口径は数百ナノメートルである。キャピラリー1の基端側には、キャピラリー1の周壁2の端面3に臨むよ

うに光ファイバー４が配設されている。光ファイバー４の基端側には光源５が配設されており、光源５からの光は光ファイバーを介してキャピラリー１の周壁２の基端面３に対して、キャピラリー１の先端へ向かって周壁２の長さ方向に供給され、光は周壁２をライトガイドとして、キャピラリー１の先端側に供給される。

図示のものでは、キャピラリー１の基端面３に対向して、周壁２の周方向に等間隔を存して４本の光ファイバー４を配設したものを示したが、光ファイバー４の本数は特には限定されるものではなく、３本以下でもよいし、５本以上であってもよい。

キャピラリー１の周壁２の基端側の外周には短筒状のブラケット６が外嵌されており、ブラケット６の外壁の一部には螺子が刻設されている。光ファイバー４は、筒状の支持部材７によって支持されており、支持部材７の開口側の内壁にはブラケット６の螺子に螺合する螺子が刻設されている。支持部材７をブラケット６に装着することで、光ファイバー４の先端がキャピラリー１の周壁の基端面２に近接対向するように構成されている。

キャピラリー１の内部には、光増感剤を含む注入液（注入液には細胞に導入しようとする物質、例えば遺伝子等を含む）８が充填されていると共に、装置にはキャピラリー１内部空間を加圧するための加圧手段９が設けてある。

このように構成されたマイクロインジェクション装置を用いて、細胞内に所望物質を注入する方法について図１、図２、図３に基づいて説明する。図２は、膜構造体とキャピラリーの先端部位のみを示す図である。図中、参照符号１０は膜構造体として例示する細胞膜である。図３は膜穿孔技術を示すフローチャートである。図３では、キャピラリー１を保持体として記載している。

インジェクション作業に際しては、キャピラリーの先端が物理的

に細胞膜 10 を穿孔しないような低速度（例えば 7 マイクロメートル／秒）でキャピラリーを細胞膜 10 に接触させる（図 2（a））。この状態で、加圧手段 9 によって、光増感剤を含む注入液 8 を細胞膜 10 に対して押出す（図 2（b））。光増感剤は細胞膜 10 に接触し、浸透して行く。尚、活性酸素は発生してからある程度の距離内であれば拡散するので、活性酸素の発生箇所から膜が離れていても（例えば数マイクロメートル）、膜変性の効果はあるものと考えられ、膜変性体としての光増感剤は必ずしも膜に直接接触していなくてもよいと考えられる。もっとも、光増感剤を含む注入液を導入する手段は、加圧手段を用いることで強制的に行うものに限定されるものではなく、自然な拡散によって細胞に作用するものであってもよい。また、圧力をかけることに代えて、通電によって注入を行う手段、例えば電気泳動によって注入を行うものであってもよい。

同時に、光源 5 から供給された光刺激は、キャピラリー 1 の周壁 2 の端面 3 からキャピラリー周壁 2 内に導入され、キャピラリー周壁 2 をライドガイドとして、キャピラリー 1 の先端に伝搬される。そして、光はキャピラリー 1 の周壁 2 の先端から照射される。このことによって、光増感剤が接触（膜に浸透している場合を含む）している細胞膜 10 のうち、光が照射された部位のみが光増感剤によって変性されて膜変性部位 11 を形成する。

膜変性部位 11 は劣化して柔軟性が低下しているので、キャピラリー 1 を低速で移動させれば、キャピラリー 1 の先端を容易に細胞膜内に刺入させることができる（図 2（c））。この状態で、加圧手段 9 によって、光増感剤を含む注入液 8 を細胞膜 10 内に注入する。その後、キャピラリー 1 の先端部位を細胞膜 10 から引き抜けば、穿孔された細胞膜 10 は修復して元の状態に復帰する。

尚、本実施の形態では、キャピラリー 1 は市販のものをを用いてい

るため、クラッド層を有せず、実際には周壁 2 から光が漏れる。しかしながら、光が漏れる箇所は周壁 2 が直線部分から傾斜部分に移行する屈曲部位（先端から 5 ミリメートル）に集中する。細胞に液が注入される容量は極めて微量であり、キャピラリー 1 のごく先端部分（2 ～ 3 ミリメートル以下）にあるため、光漏れ位置からの影響は少ないと考えられる。また、このことに関連して、通常の光ファイバーをキャピラリーと同様の加熱処理により引き延ばし鋭くした、微小な光照射ファイバーのような部材から膜破壊部材（支持体）を構成すれば、光漏れの問題はない。

図 4 は、本発明を採用したマイクロインジェクション装置の他の好ましい一つの実施の形態を示す概略図であって、このものでは、図 1 のものと同様に、刺激として光を、膜変性反応を誘起させる化合物として光増感剤を、それぞれ採用している。

このものでは、キャピラリー 2 の中に、キャピラリー 2 の長さ方向全体にわたって光ファイバー 4 が芯状に延設されており、光ファイバー 4 の先端はキャピラリー 2 の先端にまで延出している。このものでは、刺激としての光は、光ファイバー 4 内を通過して、膜に接触した光増感剤に与えられるので、光がキャピラリー 2 に充填された遺伝子等の注入物に悪影響を与えることがない。

図 5 は、本発明の他の実施の形態を示す図であり、このものでは、キャピラリー 1 の周壁の外部に光触媒を成膜し、光によって該光触媒を活性化させるようにしている。光触媒は、一つの好ましい態様では、酸化チタンであり、刺激としての光は該酸化チタンを活性化させる波長の光から選択される。光触媒が被覆される部位は、キャピラリーの先端部、特に膜に接触する部位に設けられていればよい。図示のものでは、水溶性蛍光染色試薬 Lucifer Yellow CH 2 ミリモル濃度を含むインジェクション液を神経系株化細胞 PC 1 2

に注入するものである。PC 1 2 細胞は、中枢神経のモデルとして用いられるラット副腎髄室由来の神経節類似細胞である。光触媒によって細胞膜を一時的に酸化して物性を変化させることで、細胞表面にキャピラリーを低速であてがっても、細胞膜を貫通させることができる。

図 6 は、キャピラリーの周壁に成膜した酸化チタンの膜厚に関連するインジェクション成功率を示す図である。図 6 は、膜変性体としての光触媒の効果を示すことを目的とするものであって、図 6 におけるデータは、光は直接キャピラリーに当ててあり、キャピラリーの周壁をライドガイドとして光を供給するものではない。機械的剪断力による膜穿孔が困難なアプローチ条件下において、光増感機構を利用したインジェクション成功率の比較実験を行った。インジェクション作業に際しては、キャピラリー接触速度 1000 マイクロメートル／秒で細胞にキャピラリーが刺入できるようにマニピュレーターの動作範囲を設定した上で、キャピラリーを 7 マイクロメートル／秒の低速度で動作させ、機械的に細胞膜を穿孔しないようにキャピラリーを細胞膜に接触させた。実験においては、キャピラリー上の酸化チタン光触媒層の有無、および 100 W 水銀ランプによる 1 分間の光照射処理の有無により、細胞のインジェクション成功率がどのように変化するか比較実験を行った。

この結果を図 6 に示した。図 6 において横軸は実験条件、縦軸はインジェクション成功率（単位％）を示す。酸化チタンで被覆しなかったキャピラリーではインジェクション成功率は約 10％であった。一方、キャピラリーを 120 ナノメートル膜厚酸化チタンで被覆した場合には、紫外光を 1 分照射することで、約 40％の確立でインジェクションが成功した。また、このキャピラリーを使用し紫外光を照射しなかった場合にはインジェクション成功率は約 10％

に留まり、向上は認められなかった。キャピラリーを 180 ナノメートル膜厚酸化チタンで被覆した場合には、紫外光を 1 分照射することで、約 60% の確立でインジェクションが成功した。また、紫外光を照射しない場合でも若干の向上が認められ、約 20% の確立でインジェクションが成功した。これは室内光によって光触媒が活性化された結果、インジェクション成功率が上がった可能性がある。

今回実施したマイクロインジェクション実験においては、キャピラリーを酸化チタンで被覆しなかった場合や、紫外光照射を行わなかった場合は 2 割程度しかインジェクションは成功しなかった。そのような対照実験に対して、酸化チタンを使用し、光照射を行った場合はインジェクション成功率は最大約 6 割と有為に高かった。これは酸化チタンが光照射によって細胞膜の穿孔に寄与したことを示している。また、酸化チタンの光触媒活性は 2 マイクロメートル程度の膜厚まで、膜厚に比例して高まるとされている。今回の実験も、膜が厚い方がインジェクション成功率が高まる結果となっており、本実験は光触媒活性がマイクロインジェクションの効率を高めるのに有効であったことを強く示唆するものである。

産業上の利用可能性

本発明によれば、膜変性によって、細胞膜にキャピラリーをあてがう程度の弱い剪断力でも、膜を穿孔可能にすることができ、物理的剪断力に依存することなく膜の穿孔を行なうことができる。したがって、本発明は、マイクロインジェクション装置等に用いることができる。一つの好ましい利用形態では、本発明は、遺伝子を細胞内へ導入することに用いることができる。

請 求 の 範 囲

1. 刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体を、膜の少なくとも一部に接触あるいは近接させ、該膜変性体に該刺激を与えることで該膜を変性させて膜破壊部材によって該膜を穿孔する方法であって、該刺激は該膜破壊部材を媒体として与えられることを特徴とする膜の穿孔方法。

2. 刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体を、該膜変性体を保持する保持体によって膜の少なくとも一部に接触あるいは近接させ、該膜変性体に該刺激を与えることで該膜を変性させて膜を穿孔する方法であって、該刺激は該保持体を媒体として与えられることを特徴とする膜の穿孔方法。

3. 刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体を、膜の少なくとも一部に接触あるいは近接させ、該膜変性体に該刺激を与えることで該膜を変性させて膜を穿孔する方法であって、該刺激を刺激伝搬部材を介して伝搬させて、該膜変性体の所望部位に局所的に刺激を与えることを特徴とする膜の穿孔方法。

4. 前記膜は細胞膜、細胞壁、生体膜または人工膜であることを特徴とする請求項1乃至3いずれかに記載の膜の穿孔方法。

5. 前記刺激は、光を含む電磁波、放射線を含む粒子線、熱、冷却、電気、磁気、超音波を含む振動、物理的接触、化学物質、細胞を含む生物、ウイルスからなる群から選択される一つの刺激あるいは複数の刺激の組み合わせであることを特徴とする請求項1乃至4に記載の膜の穿孔方法。

6. 前記刺激が光であり、膜変性体が光増感剤であることを特徴とする請求項1乃至5いずれかに記載の膜の穿孔方法。

7. 前記刺激が光であり、膜変性体が光触媒であることを特徴とす

る請求項 1 乃至 5 いずれかに記載の膜の穿孔方法。

8. 前記穿孔方法は、膜変性体を保持する保持体と、膜を穿孔する膜破壊部材と、刺激を伝搬する刺激伝搬部材とを用いており、該保持体と該膜破壊部材と該刺激伝搬部材とは同一部材であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 いずれかに記載の膜の穿孔方法。

9. 前記同一部材はキャピラリーであることを特徴とする請求項 8 に記載の膜の穿孔方法。

10. 刺激が光であり、該キャピラリーの周壁をライトガイドとして光が伝搬し、該キャピラリーの先端部位から該膜変性体に光照射することを特徴とする請求項 9 に記載の膜の穿孔方法。

11. 刺激が光であり、該キャピラリー内、またはキャピラリー外部、あるいはキャピラリーの内外両方には長さ方向に延出する光ファイバーが延設されており、該光ファイバーの先端は該キャピラリーの先端まで延出しており、該光ファイバーの先端から該膜変性体に光照射することを特徴とする請求項 9 に記載の膜の穿孔方法。

12. 前記同一部材は、膜内刺入用センサーであることを特徴とする請求項 8 に記載の膜の穿孔方法。

13. 請求項 1 乃至 12 いずれかに記載した穿孔方法を利用して膜に穿孔し、該膜内に所望の物質を注入することを特徴とするマイクロインジェクション法。

14. 前記膜内に注入される物質には、刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体が混入されていることを特徴とする請求項 13 に記載のマイクロインジェクション法。

15. 前記刺激が光であり、前記膜変性体が光増感剤であることを特徴とする請求項 13, 14 いずれかに記載のマイクロインジェクション法。

16. 前記刺激が光であり、前記膜変性体が光触媒であることを特

徴とする請求項 13, 14 いずれかに記載のマイクロインジェクション法。

17. 前記膜内に注入される物質はキャピラリーに充填されており、該キャピラリーの先端を膜に刺入させることで、該物質は該キャピラリーを介して膜内に注入されることを特徴とする請求項 13 乃至 16 いずれかに記載のマイクロインジェクション法。

18. 刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体を保持した膜破壊部材と、該刺激の供給源とを有し、該供給源から供給された刺激は、該膜破壊部材を介して伝搬されて該膜変性体に伝達されるように構成され、該膜破壊部材を介して該膜変性体を該膜の少なくとも一部に接触あるいは近接させ、該膜変性体に該刺激を与えることで該膜を変性させて該膜破壊部材によって膜に穿孔するように構成されたことを特徴とする膜の穿孔装置。

19. 前記刺激は、光を含む電磁波、放射線を含む粒子線、熱、冷却、電気、磁気、超音波を含む振動、物理的接触、化学物質、細胞を含む生物、ウイルスからなる群から選択されることを特徴とする請求項 18 に記載の膜の穿孔装置。

20. 前記刺激が光であり、膜変性体が光増感剤であることを特徴とする請求項 18, 19 いずれかに記載の膜の穿孔装置。

21. 前記刺激が光であり、膜変性体が光触媒であることを特徴とする請求項 18, 19 いずれかに記載の膜の穿孔装置。

22. 前記刺激の供給源が光源であることを特徴とする請求項 20, 21 いずれかに記載の膜の穿孔装置。

23. 前記刺激の供給源が電力供給源あるいは熱供給源であると共に、該膜破壊部材は発光素子を備えており、該電力あるいは該熱を該発光素子を介して光刺激に変換することを特徴とする請求項 20, 21 いずれかに記載の膜の穿孔装置。

24. 該膜破壊部材はキャピラリーであることを特徴とする請求項18乃至23いずれかに記載の膜の穿孔装置。

25. 刺激が光であり、該キャピラリーの周壁をライトガイドとして光が伝搬することを特徴とする請求項24に記載の穿孔装置。

26. 刺激が光であり、該キャピラリー内、またはキャピラリー外部、あるいはキャピラリーの内外両方には長さ方向に延出する光ファイバーが延設されており、該光ファイバーの先端は該キャピラリーの先端まで延出しており、該光ファイバーの先端から光照射することを特徴とする請求項24に記載の穿孔装置。

27. 請求項24乃至26いずれかに記載の穿孔装置を備えたことを特徴とするマイクロインジェクション装置。

28. 膜内に注入される物質はキャピラリーに充填されており、該キャピラリーの先端を膜に刺入させることで、該物質は該キャピラリーを介して膜内に注入されることを特徴とする請求項27に記載されたマイクロインジェクション装置。

29. 前記膜内に注入される物質には、刺激により膜変性反応が誘起される膜変性体が混入されていることを特徴とする請求項27, 28いずれかに記載のマイクロインジェクション装置。

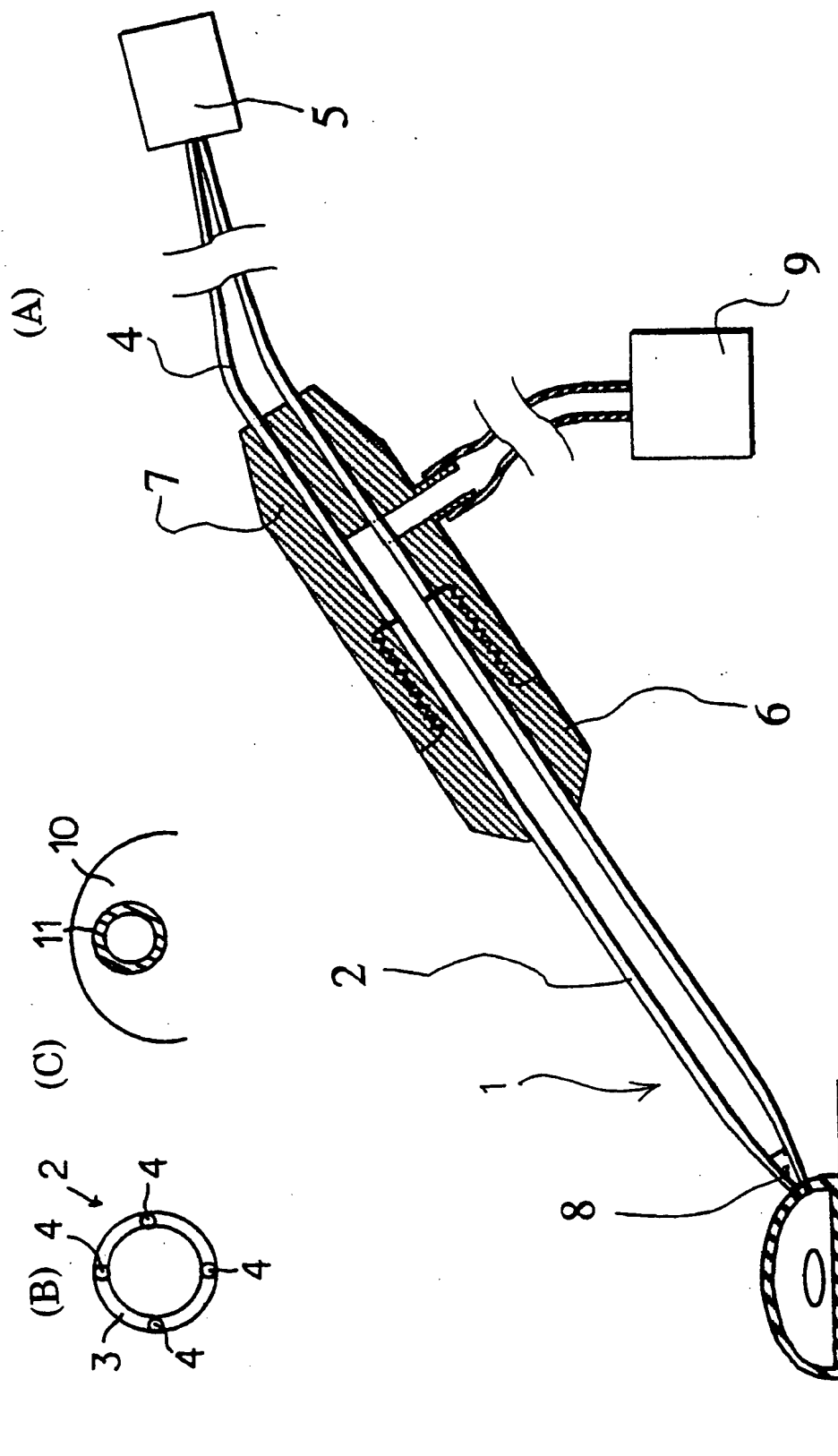
30. 前記刺激が光であり、前記膜変性体が光増感剤であることを特徴とする請求項27乃至29いずれかに記載のマイクロインジェクション装置。

31. 前記膜内に注入される物質は、核酸、蛋白質、脂質、膜構造体、マイクロマシン、微小磁性体からなる群から選択されるものであることを特徴とする請求項27乃至30いずれかに記載のマイクロインジェクション装置。



1/6

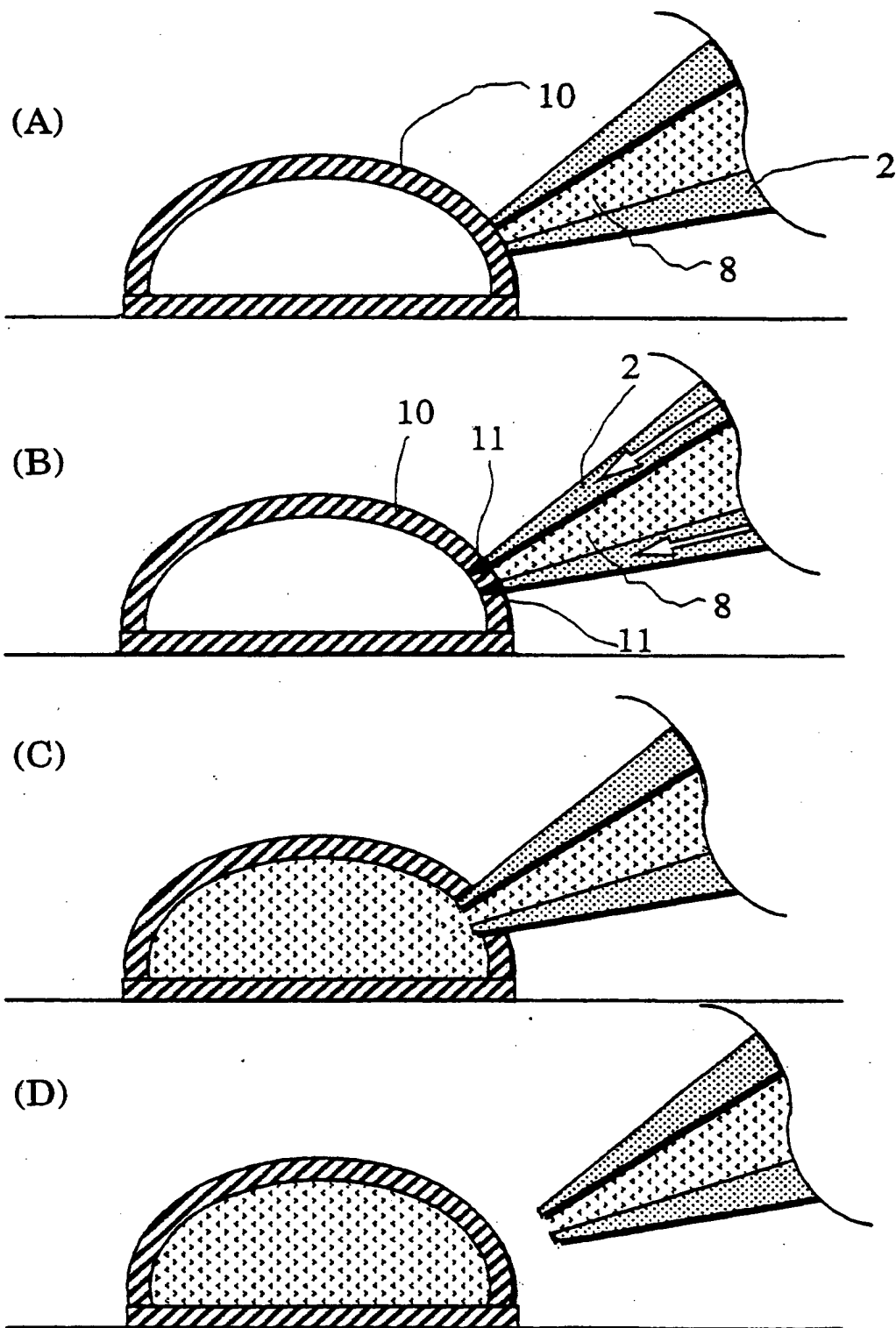
第1図





第2図

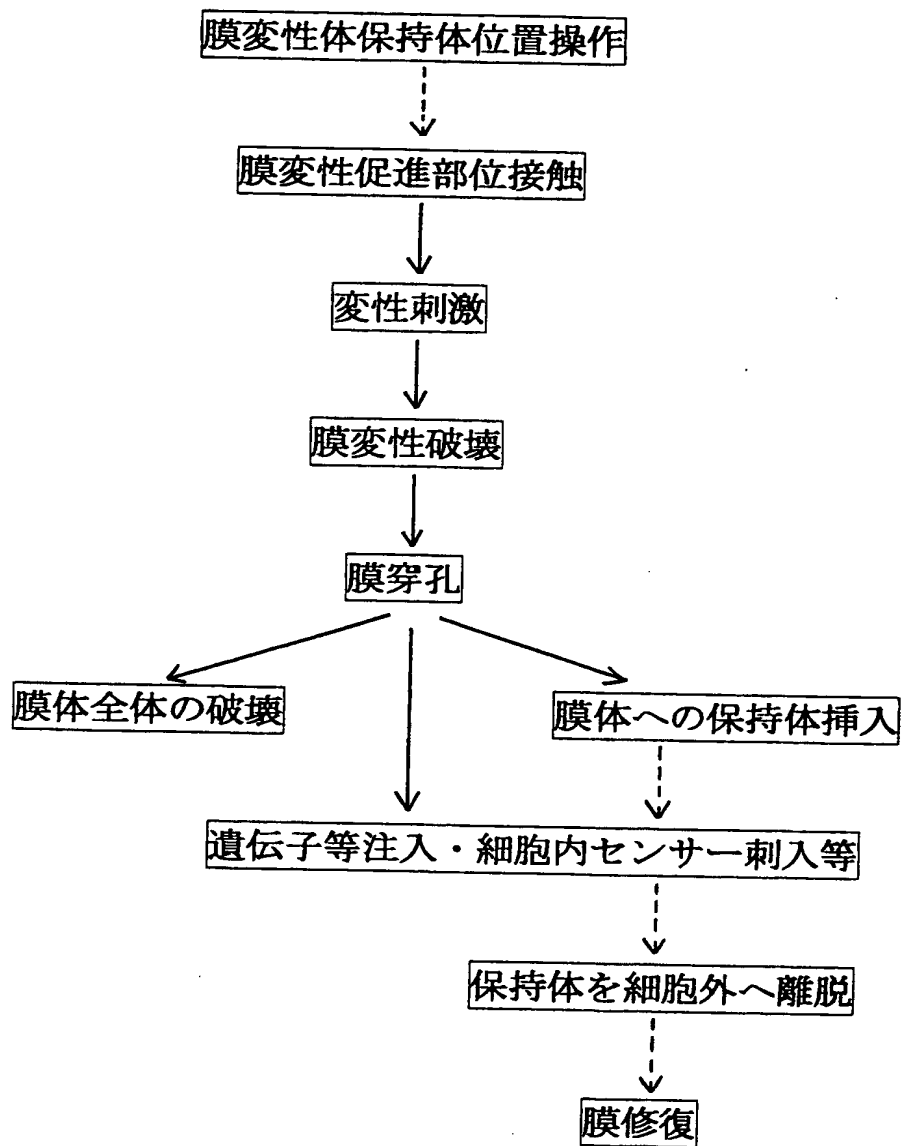
2/6





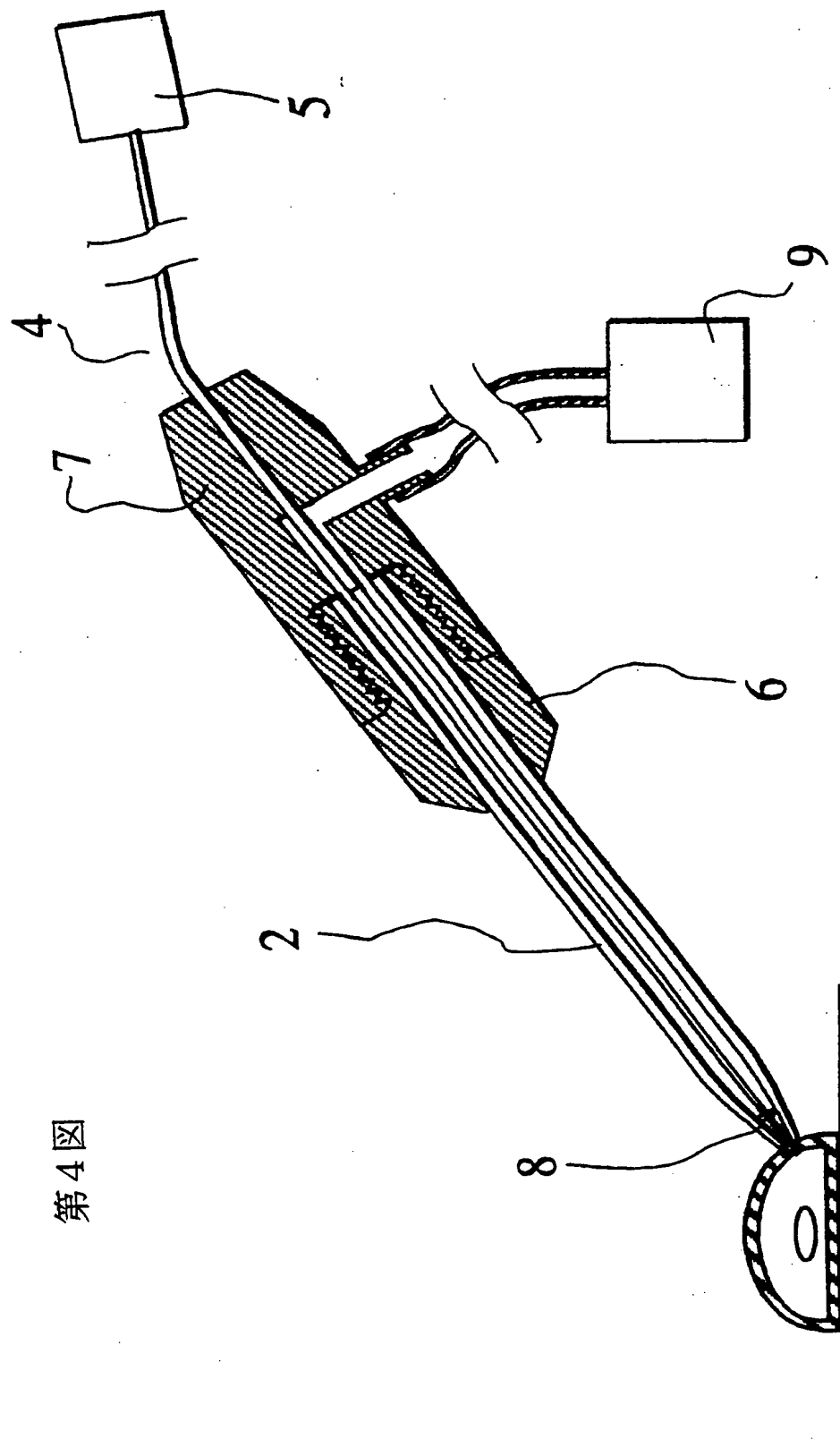
3 / 6

第3図





4/6



第4図



5 / 6

第5図

光触媒(酸化チタン)

(A) 10

8(蛍光色素液)

光照射 3.3 W cm^{-2}

60 秒

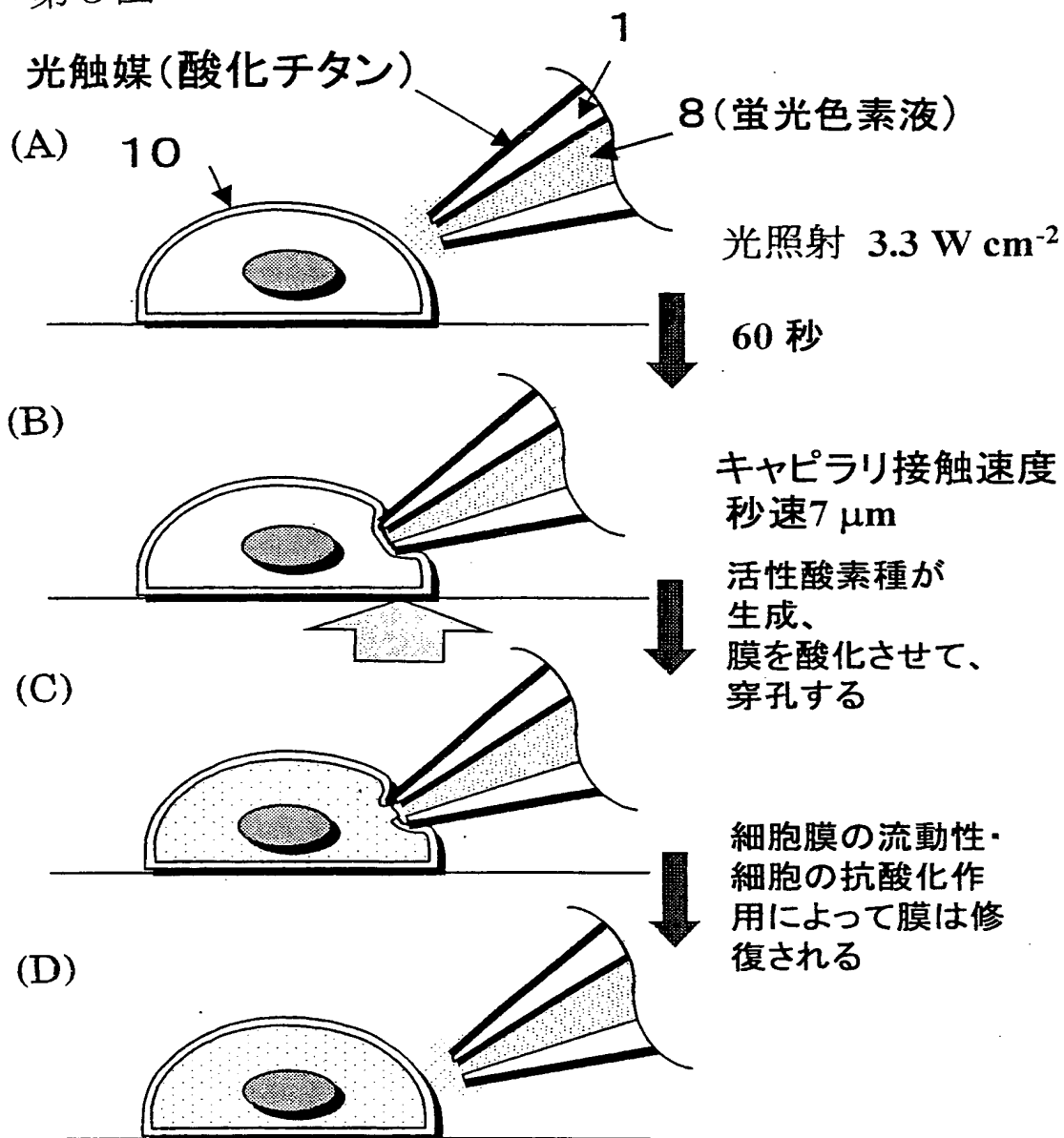
(B)

キャピラリ接触速度
秒速 $7 \mu\text{m}$ 活性酸素種が
生成、
膜を酸化させて、
穿孔する

(C)

細胞膜の流動性・
細胞の抗酸化作
用によって膜は修
復される

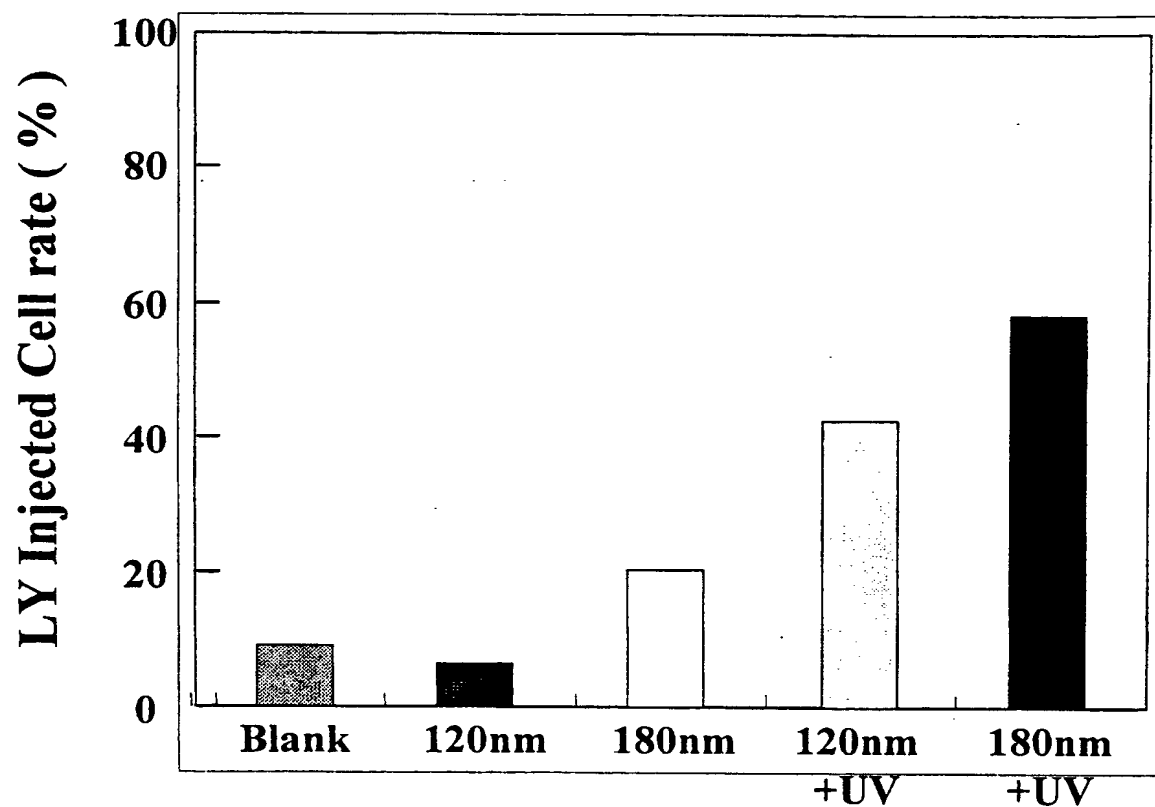
(D)





第 6 図

6 / 6





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12M1/00, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/00, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Takashi SAITO et al., "Kouzoukan Sayou wo Riyoushita Micro Injection," Seitai Seiri Kougaku Symposium Ronbunshu (1999) Vol. 14, pp. 77-80	1-8, 13-16, 18-23, 27, 29-31
X	JP, 8-322548, A (Nikon Corporation), 10 December, 1996 (10.12.96) (Family: none)	1-5, 8, 9, 13, 14, 17-19, 24, 27-29
A		6, 7, 10, 11, 12, 15, 16, 20-23, 25, 26, 30, 31,
X	Saito T et al. "Light dose and time dependency of photodynamic cell membrane damage," Photochem Photobiol (1998) Vol.68, No.5, pp.745-748	1-2, 4-6, 13-15, 18-20, 22, 23
A		3, 7-12, 16, 17, 21, 24-31
A	Atsushi KITAYAMA et al., "Denki Senkouhou ni yoru Bacteria e no DNA no Dounyu," Chemical Engineering (1990), Vol. 35, No.12, pp.944-948, p.978	1-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 November, 2000 (20.11.00)

Date of mailing of the international search report
28 November, 2000 (28.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nobuo KIMURA et al., "Laser shiki Self Processor no Kaihatsu," O plus E (1989) No. 113, pp.100-103	1-31
A	Yoshihiro KASUYA et al., "Laser Saibou Shujutsu ni yoru Idenshi Inyu," laser Kenkyu (1987) Vol. 15, No.8, pp. 624-635	1-31

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12M1/00, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12M1/00, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	齋藤 敬 等「光増感作用を利用したマイクロインジュクション」 生体・生理工学シンポジウム論文集 (1999. 10月) 第14巻 第77-80頁	1-8, 13-16, 18-23, 27, 29-31
X A	JP, 8-322548, A (株式会社ニコン) 10. 12月. 1996 (10. 12. 96) ファミリーなし	1-5, 8, 9, 13, 14, 17-19, 24, 27-29 6, 7, 10, 11, 12 15, 16, 20-23, 25, 26, 30, 31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
20. 11. 00

国際調査報告の発送日
28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
上條 肇



4N 9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Saito T et al. "Light dose and time dependency of photodynamic cell membrane damage" Photochem Photobiol (1998) Vol. 68 No. 5 p. 745-748	1-2, 4-6, 13-15, 18-20, <u>22, 23</u> 3, 7-12, 16, 17, 21, 24-31
A	喜多山 篤 等「電気穿孔法によるバクテリアへのDNAの導入」 ケミカル・エンジニアリング (1990) 第35巻 第12号 944-948, 978頁	1-31
A	木村 信夫 等「レーザー式セルフプロセッサの開発」 O plus E (1989) 第113号 100-103頁	1-31
A	粕谷 敬宏 等「レーザー細胞手術による遺伝子移入」 レーザー研究 (1987) 第15巻 第8号 624-635頁	1-31